

PCT
 WELTORGANISATION FÜR GEIS
 Internationales Bu
 INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICH
 INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEN



WO 9606909A2

(51) Internationale Patentklassifikation ⁶ : C11D 3/386, C12N 9/02		A2	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 96/06909
			(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 7. März 1996 (07.03.96)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP95/03342		(81) Bestimmungsstaaten: AU, BR, CA, CN, CZ, FI, HU, JP, KR, MX, NO, NZ, PL, RU, SG, SI, SK, UA, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).	
(22) Internationales Anmeldedatum: 23. August 1995 (23.08.95)			
(30) Prioritätsdaten: P 44 30 327.0 27. August 1994 (27.08.94) DE		Veröffentlicht <i>Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.</i>	
(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): DEGUSSA AKTIENGESELLSCHAFT [DE/DE]; Weissfrauenstrasse 9, D-60311 Frankfurt am Main (DE).			
(72) Erfinder; und			
(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): VAN PEE, Karl-Heinz [DE/DE]; Lipsiusstrasse 12, D-01309 Dresden (DE). HECHT, Hans-Jürgen [DE/DE]; Erlenkamp 25, D-38126 Braunschweig (DE). BERKESSEL, Albrecht [DE/DE]; Friedrichsfelder Strasse 11a, D-68535 Edingen (DE). SCHRAPEL, Thomas [DE/DE]; Südring 9, D-37120 Bovenden (DE). LAATSCH, Hartmut [DE/DE]; Adolf-Ellissen-Weg 21, D-37077 Göttingen (DE).			

(54) Title: ENZYMATIC, ACTIVE OXYGEN-RELEASING MIXTURE AND PERACID PRODUCTION

(54) Bezeichnung: ENZYMATISCHE, AKTIVEN SAUERSTOFF LIEFERNDE MISCHUNG SOWIE HERSTELLUNG VON PERSÄUREN

(57) Abstract

Enzymatic, active oxygen-releasing mixtures may be used as oxidising agents for preparing chemical compounds and in bleaching, washing, cleaning and disinfecting agents. According to the invention the mixture contains oxidoreductase with an α/β -hydrolase fold and a catalytic triad consisting of aminoacids serine, histidine and aspartic acid, a peroxide source, and an aqueous solution of an organic acid or its salt. In order to produce organic peracids, organic acids or their salts in an aqueous solution are converted into organic peracids in the presence of oxidoreductase with an α/β -hydrolase fold and a catalytic triad consisting of aminoacids serine, histidine and aspartic acid, and hydrogen peroxide or peroxide compounds, at a pH value from 3.5 to 6.0 and temperatures from 15 to 80 °C.

(57) Zusammenfassung

Enzymatische, aktiven Sauerstoff liefernde Mischungen können Anwendung als Oxidationsmittel zur Herstellung chemischer Verbindungen sowie in Bleich-, Wasch-, Reinigungs- und Desinfektionsmitteln finden. Erfindungsgemäß besteht die Mischung aus Oxidoreduktase mit einer α/β -Hydrolase-Faltung und einer katalytischen Triade aus den Aminosäuren Serin, Histidin und Asparaginsäure, einer Peroxidquelle, einer wässrigen Lösung einer organischen Säure oder deren Salz. Die Herstellung organischer Persäuren erfolgt erfindungsgemäß derart, daß in Anwesenheit von Oxidoreduktase mit einer α/β -Hydrolase-Faltung und einer katalytischen Triade aus den Aminosäuren Serin, Histidin und Asparaginsäure und Wasserstoffperoxid oder Peroxidverbindungen organische Säuren oder deren Salze in wässriger Lösung bei einem pH-Wert von 3,5 bis 6,0 und bei Temperaturen zwischen 15 und 80 °C zu organischen Persäuren umgewandelt werden.

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AT	Oesterreich	GA	Gabon	MR	Mauretanien
AU	Australien	GB	Vereinigtes Königreich	MW	Malawi
BB	Barbados	GE	Georgien	NE	Niger
BE	Belgien	GN	Guinea	NL	Niederlande
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	NO	Norwegen
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	NZ	Neuseeland
BJ	Benin	IE	Irland	PL	Polen
BR	Brasilien	IT	Italien	PT	Portugal
BY	Belarus	JP	Japan	RO	Rumänien
CA	Kanada	KE	Kenya	RU	Russische Föderation
CF	Zentrale Afrikanische Republik	KG	Kirgisistan	SD	Sudan
CG	Kongo	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SE	Schweden
CH	Schweiz	KR	Republik Korea	SI	Slowenien
CI	Côte d'Ivoire	KZ	Kasachstan	SK	Slowakei
CM	Kamerun	LI	Liechtenstein	SN	Senegal
CN	China	LK	Sri Lanka	TD	Tschad
CS	Tschechoslowakei	LU	Luxemburg	TG	Togo
CZ	Tschechische Republik	LV	Lettland	TJ	Tadschikistan
DE	Deutschland	MC	Monaco	TT	Trinidad und Tobago
DK	Dänemark	MD	Republik Moldau	UA	Ukraine
ES	Spanien	MG	Madagaskar	US	Vereinigte Staaten von Amerika
FI	Finnland	ML	Mali	UZ	Usbekistan
FR	Frankreich	MN	Mongolei	VN	Vietnam

**Enzymatische, aktiven Sauerstoff liefernde Mischung sowie
Herstellung von Persäuren**

Beschreibung

- 5 Die Erfindung betrifft eine enzymatische, aktiven Sauerstoff liefernde Mischung sowie ein Verfahren zur enzymatischen Herstellung von Persäuren. Enzymatische, aktiven Sauerstoff liefernde Mischungen finden Anwendung bei Oxidationsreaktionen zur Herstellung chemischer 10 Verbindungen. Derartige Mischungen sind aber auch als oxidative Bleichmittel in Waschmittelzusammensetzungen wirksam. Das erfindungsgemäße Verfahren ist insbesondere bei der Synthese organischer Verbindungen anwendbar, bei denen die *in situ* gebildete Persäure als oxidierender 15 Reaktionspartner teilnimmt.

Bekannt ist die chemische Persäureherstellung, die über die Umsetzung von Säureanhydriden und Säurehalogeniden mit Wasserstoffperoxid erfolgt. Technisch lassen sich Persäuren aus Carbonsäuren und Wasserstoffperoxid in Gegenwart von 20 Mineralsäuren herstellen. Die Persäuren sind außerordentlich instabil. Bei Erhitzen können derartige Verbindungen ohne Vorwarnung explodieren.

Auch wenn die hohe Reaktivität organischer Persäuren bekannt und für viele chemische Reaktionen von Vorteil 25 ist, fanden bislang im wesentlichen Natriumperborate als Bleichmittel in Waschmitteln Anwendung. Aus der US-PS 5,296,161 ist ein Verfahren bekannt, das ausgehend von der enzymatischen Aktivität von Esterasen - katalytisch Ester zu verseifen - diese Wirkung nutzt, um organische Persäuren 30 in Lösung herzustellen und deren sauerstoffbildende Aktivität beispielsweise für Bleichprozesse zu nutzen. Dabei werden in Gegenwart von Esterasen und Lipasen Fettsaureester definierter Struktur enzymatisch unter

Bildung von Persäuren gespalten. Aufgrund der Anwendung von Fettsäureestern erfordern derartige Systeme jedoch zusätzliche Emulgatoren, um das System in Lösung bzw. Suspension zu halten und dadurch die enzymatische Reaktion 5 zu ermöglichen. "nabhängig dessen, daß bei diesem System nach Verbrauch bzw. Reaktion der Reaktionskomponenten ökologisch schwer abbaubare Produkte entstehen können, setzt dieses System zunächst eine aufwendige Synthese definierter Verbindungen - hier Glyzeridverbindungen - 10 voraus. Zum anderen entwickeln sich hier längerkettige Persäuren, deren Reaktivität gegenüber niederkettigen organischen Persäuren vermindert ist. Eingeschränkt ist auch der Temperaturbereich derartiger enzymatischer Systeme, was deren Anwendung als Bleichmittel, 15 beispielsweise bei Voll- und Kaltwaschmitteln begrenzt.

Bedingt durch die hohe Reaktivität niederkettiger organischer Persäuren, sind solche Verbindungen bevorzugt Reaktionspartner in der Synthese organischer Verbindungen. Die Anwendung von Persäuren war aufgrund der Reaktivität 20 bislang aber auf die laborchemische Synthese beschränkt. Auch die enzymatische Synthese nach US-PS 5,296,161 erlaubt nicht die gezielte Herstellung reaktiver, niederkettiger organischer Persäuren und ist aufgrund der beteiligten, spezifischen Reaktionspartner in ihrem Einsatzbereich bei 25 der Synthese organischer Verbindungen eingeschränkt.

Aufgabe der Erfindung ist es, in einfacher Weise enzymatisch organische Persäuren herzustellen und eine Mischung als Lieferant aktiven Sauerstoffs für die unterschiedlichsten Anwendungen bereitzustellen.

30 Erfindungsgemäß besteht die enzymatische, aktiven Sauerstoff liefernde Mischung aus

- Oxidoreduktase mit einer α/β -Hydrolase-Faltung und einer katalytischen Triade aus den Aminosäuren Serin, Histidin und Asparaginsäure

- einer Peroxidquelle und
- einer organischen Säure oder deren Salz,

wobei die Mischung in wässriger Lösung angewandt wird.

Bei flüssiger Form der Mischungskomponenten wird die
5 Peroxidquelle getrennt von den anderen Komponenten
aufbewahrt.

Dadurch, daß sich das erfindungsgemäße Enzym
gefriertrocknen und bei Raumtemperatur auch über längere
Zeiten aufbewahren läßt, kann das Enzym z.B. in Verbindung
10 mit Natriumacetat und Natriumperborat in einer
Feststoffmischung angewandt werden.

Bei Anwendung der erfindungsgemäßen Mischung in wässriger
Lösung katalysiert das Enzym die Umwandlung der
organischen Säure in Persäure unter Beteiligung der
15 Peroxidquelle.

Die erfindungsgemäß verwendeten Enzyme können aus
unterschiedlichen Organismen (Pro- und Eukaryonten)
isoliert werden. Vorzugsweise wird als Enzym bakterielle
Nicht-Häm-Haloperoxidase, z. B. Chlorperoxidase oder
20 Bromperoxidase unterschiedlicher Herkunftsstämme für die
erfindungsgemäße Mischung bzw. das erfindungsgemäße
Verfahren angewandt.

Als organische Säure werden vorzugsweise Mono- und
Dicarbonsäuren und Hydroxycarbonsäuren mit 2 bis 4 C-
25 Atomen, wie insbesondere Essigsäure, Propionsäure oder
Milchsäure bzw. deren Salze eingesetzt. Als Peroxidquelle
werden vorzugsweise Wasserstoffperoxid oder
Wasserstoffperoxid freisetzende Verbindungen, wie
Perborate, insbesondere Natriumperborat, Percarbonate,
30 insbesondere Natriumpercarbonat, und Persulfate genutzt.

Die angewandte Enzymmenge ist abhängig vom Volumen des
Gesamtsystems und beträgt vorzugsweise pro 0,15 bis 50 µmol

Wasserstoffperoxid und pro 100 µmol Säure oder Salz 8 bis 16 mU Enzym. Wird statt Wasserstoffperoxid eine andere Peroxidquelle eingesetzt, beispielsweise Natriumperborat, bezieht sich die einzusetzende Menge auf das daraus 5 freigesetzte Wasserstoffperoxid. Die Enzymeinheit U bezeichnet die Enzymmenge, die ein µmol Substrat pro Minute umsetzt.

Der pH-Bereich der erfindungsgemäßen Mischung wird durch die beteiligte organische Säure oder deren Salze im Bereich 10 3,5 bis 6 gepuffert. Die Anwendungstemperatur der erfindungsgemäßen Mischung kann je nach verwendetem Enzym zwischen 20 und 80 °C liegen.

Die erfindungsgemäßen Oxidoreduktasen besitzen gleiche Strukturmerkmale, nämlich eine α/β-Hydrolase-Faltung und 15 eine katalytischen Triade aus den Aminosäuren Serin, Histidin und Asparaginsäure. Neben diesen Merkmalen benötigen die angewandten bakteriellen Nicht-Häm-Haloperoxidinasen im Gegensatz zu den hämhältigen Haloperoxidinasen keine Häm-Gruppe als prosthetische Gruppe 20 und im Gegensatz zu den eukaryontischen Nicht-Häm-Haloperoxidinasen auch keine Metallionen oder andere Co-Faktoren für ihre Aktivität.

Überraschend hat sich gezeigt, daß die erfindungsgemäßen Enzyme durch Hydrolyse eines Serinesters in Verbindung mit 25 Wasserstoffperoxid Persäuren bilden, die dann als oxidierendes Agens wirken. Der Serinester entsteht dabei durch Reaktion der organischen Säure mit einem Serinrest im aktiven Zentrum des Enzyms.

Die erfindungsgemäß verwendeten Oxidoreduktasen sind durch 30 Klonierung der Gene und Überexpression leicht in großen Mengen darstellbar.

Die erfindungsgemäße Mischung läßt sich aufgrund ihrer oxidativen Wirkung verschiedentlich anwenden, z. B. in der

Synthese organischer Verbindungen, oder generell als Oxidationsreagenz. Ein derartiges Anwendungsgebiet sind Bleichmittel, etwa Bleichmittel für Papier und Textilien, insbesondere für Bleichprozesse im sauren bis neutralen pH-5 Bereich. Aufgrund der hohen bioziden Wirksamkeit von niederen Percarbonäuren eignet sich die erfindungsgemäße Mischung auch als Desinfektionsmittel zur Desinfektion von wässrigen Lösungen und Oberflächen oder zur Herstellung von Desinfektionsmitteln. Als Zusatz in Wasch-, Bleich-, Reinigungs- und Desinfektionsmitteln angewendet, reagieren die in situ aus der erfindungsgemäßen Mischung gebildeten Persauren durch Oxidation mit Schmutzstoffen, färbenden Komponenten und Mikroorganismen.

Erfindungsgemäß wird das Verfahren zur enzymatischen Herstellung organischer Persauren so geführt, daß 15 Oxidoreduktase mit einer α/β -Hydrolase-Faltung und einer katalytischen Triade aus den Aminosäuren Serin, Histidin und Asparaginsäure in Gegenwart von Wasserstoffperoxid, einer organischen Säure oder deren Salze bei einem pH-Wert 20 von 3,5 bis 6,0 und bei Temperaturen zwischen 15 und 80 °C die Bildung der organischen Persäure katalysieren. Verwendet man in diesem Prozeß Essigsäure, bildet sich in situ als Reaktionsprodukt Peressigsäure, bei Verwendung von Propionsäure oder Milchsäure analog Perpropionsäure oder 25 Permilchsäure.

Vorzugsweise wird als Enzym bakterielle Nicht-Häm-Haloperoxidase, z. B. Chlorperoxidase oder Bromperoxidase, als Peroxidverbindung Wasserstoffperoxid oder Natriumperborat und als organische Säure Essigsäure oder 30 Propionsäure oder Milchsäure oder deren Salze eingesetzt. Der Enzymanteil beträgt vorzugsweise pro 0,15 bis 50 μmol Wasserstoffperoxid und pro 100 μmol Säure oder Salz 8 bis 16 μU Enzym. Wird statt Wasserstoffperoxid Natriumperborat eingesetzt, bezieht sich die einzusetzende Menge auf das 35 daraus freigesetzte Wasserstoffperoxid.

Die nach dem erfindungsgemäßen Verfahren hergestellte Persäure ist außerordentlich reaktiv. Sie oxidiert Verbindungen oder zersetzt sich unter Bildung von aktivem Sauerstoff und freier Säure. Der aktive Sauerstoff kann 5 damit als Reaktionspartner genutzt werden. Über derartige Oxidationsreaktionen läßt sich auch die in situ gebildete Persäure nachweisen, beispielsweise durch Oxidation von Anilin zu Nitrobenzol. In Gegenwart von Halogenidionen werden diese in situ oxidiert und bei Anwesenheit von für 10 die elektrophile Substitution geeigneten Substraten kommt es zu Halogenierungsreaktionen. Unabhängig dessen, daß sich über die vorgenannten Oxidationsreaktionen die in situ gebildeten Persäuren nachweisen lassen, zeigen diese Beispiele ein vorteilhaftes Anwendungsgebiet des 15 erfindungsgemäßen Verfahrens bei der Synthese organischer Verbindungen.

Anhand nachfolgender Ausführungsbeispiele, eines beigefügten Sequenzprotokolls mit Aminosäuresequenzen untersuchter Enzyme sowie der Figuren 1 und 2 soll die 20 Erfindung näher erläutert werden. Dabei zeigen:

Fig. 1: dreidimensionale Struktur des Enzyms
Bromperoxidase-A2 aus Streptomyces aureofaciens
ATCC 10762 - Gesamtansicht

Fig. 2: Ausschnitt aus der dreidimensionalen Struktur des
25 Enzyms Bromperoxidase-A2 aus Streptomyces
aureofaciens ATCC 10762

Enzyme

Folgende Enzyme werden verwandt:

30 - Chlorperoxidase aus Pseudomonas pyrrocinia,
nachfolgend mit CPO-P bezeichnet

- Bromperoxidase A1 aus *Streptomyces aureofaciens* ATCC 10762, nachfolgend mit BPO-A1 bezeichnet
 - Bromperoxidase A2 aus *Streptomyces aureofaciens* ATCC 10762, nachfolgend mit BPO-A2 bezeichnet
- 5 - Chlorperoxidase aus *Streptomyces aureofaciens* TÜ 24, nachfolgend mit CPO-T bezeichnet
- Chlorperoxidase aus *Streptomyces lividans*, nachfolgend mit CPO-L bezeichnet
 - Chlorperoxidase aus *Pseudomonas fluorescens*, nachfolgend mit CPO-F bezeichnet
- 10 - Chlorperoxidase aus *Serratia marcescens*, nachfolgend mit CPO-S bezeichnet
- Acetylcholinesterase aus Zitteraal, nachfolgend mit Ace bezeichnet
- 15 Die Herstellung der Enzyme erfolgt im wesentlichen nach Zellaufschluß und Entfernen der unlöslichen Zellbestandteile durch Zentrifugation je nach Enzym über Hitzeschritt, Fällung von Fremdproteinen durch pH-Erniedrigung und anschließender Säulenchromatographie an unterschiedlichen Medien.
- 20

Das Gen der Bromperoxidase A2 aus *Streptomyces aureofaciens* ATCC 10762 sowie auch die Überexpression mit anschließender Reinigung ist im J. Gen. Microbiol. 138, S. 1123-1131 (1992) beschrieben. Die Reinigungen der Bromperoxidasen BPO-A1 und BPO-A2 aus *S. aureofaciens* ATCC 10762 sind in J. Gen. Microbiol. 137, S. 2539-2546 (1992) veröffentlicht.

Die Reinigungen der Chlorperoxidasen von *Streptomyces aureofaciens* TÜ 24 (CPO-T) und *Pseudomonas pyrrocinia* finden sich im Biol. Chem. Hoppe-Seyler 368, S. 1225-1232 (1987) bzw. J. Biol. Chem. 263, S. 13725-13732 (1988). Die Klonierung der Gene, die Überexpression und die neuen,

vereinfachten Reinigungsverfahren sind in J. Bacteriol. 170, S. 5890-5894 (1988) bzw. Gene 130, S. 131-135 (1993) beschrieben.

Eine Herstellungsvorschrift für das Enzym CPO-L findet sich 5 in J. of Bacteriology, Vol. 176, S. 2339-2347 (1994). Das Enzym CPO-S wird aus dem Wildstamm isoliert (FEMS Microbiol. Lett. Vol. 129, S. 255-260 (1995)). Das Enzym Ace ist käuflich erwerbar (Fa. Sigma).

Zur Herstellung des Enzyms CPO-F wurde zur Klonierung des 10 Gens ein synthetisches Oligonukleotid folgender Zusammensetzung verwendet:

TTT TAT AAA GAT TGG GG
 C C G C

Dieses Oligonukleotid wurde entsprechend der Angaben des 15 Herstellers mit einem DIG Oligonukleotid 3' - END Labeling Kit der Firma Boehringer Mannheim markiert und mit EcoRI-verdauter Gesamt-DNA aus Pseudomonas fluorescens hybridisiert. DNA im hybridisierenden Bereich wurde isoliert und in den Plasmid-Vektor pUC18 ligiert und für 20 die Transformation von E. coli TG 1-Zellen verwendet. Ampicillin-resistente E. coli-Transformanten wurden mit Hilfe des Oligonukleotids durch Koloniehybridisierung auf Vorhandensein des Chlorperoxidasegens hin untersucht. Der erhaltene Klon enthielt ein 9 kb großes Insert, das mit 25 BamHI/EcoRI-Verdauung zu einem 3.8 kb großen Insert verkleinert wurde. Dieses Fragment wurde ebenfalls in pUC18 ligiert und damit E.coli TG1 transformiert. Die resultierenden rekombinanten E. coli-Klone enthielten das Plasmid pSK380. Ausgehend von pSK 380 wurde durch Verdauung 30 mit XhoI ein 2,3 kb großes Insert erhalten, das wiederum in pUC18 ligiert wurde (pSK230). E. coli-Klone, die das Plasmid pSK 230 enthielten, produzierten erhöhte Mengen an CPO-F. Dazu wurde E. coli mit dem Plasmid pSK230 für 24 h gezüchtet, die Zellen durch Zentrifugation geerntet und

durch Ultraschallbehandlung aufgeschlossen. Nach Ammoniumsulfatfällung (35 - 55 % Sättigung) wurde die Proteinlösung langsam auf 55 °C erhitzt, dann auf Eis gekühlt und ausgefallenes Protein durch Zentrifugation entfernt. Anschließend wurde die Lösung auf einen Proteingehalt von 5 mg/ml eingestellt und mit 1/100 Volumen einer Trypsinlösung (10 mg/ml) versetzt und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Nach Ultrafiltration (YM30-Membran) wurde die Proteinlösung auf eine mit 10 mM Natriumacetat-Puffer, pH 5,5, equilibrierte DEAE-Sephadex-Säule (10 ml) aufgetragen. Die Elution erfolgte mit einem NaCl-Gradienten von 0 - 0,6 M in 10 mM Natriumacetat-Puffer, pH 5,5 (10 ml). Die aktiven Fraktionen wurden gesammelt und durch Ultrafiltration konzentriert. Die Proteinlösung wurde dann auf eine Sephadex G 250-Säule, equilibriert mit 0,1 M Ammoniumacetat, pH 6,8, aufgetragen und fraktioniert. Die aktiven Fraktionen werden gesammelt und bei -20 °C gelagert.

Das Sequenzprotokoll zeigt die Aminosäuresequenzen der Enzyme CPO-P, BPO-A1, BPO-A2, CPO-T, CPO-L und CPO-F. Die Aminosäuresequenzen wurden von den nach der Kettenabbruchmethode erhaltenen DNA-Sequenzen abgeleitet.

Sichtbar ist, daß die Aminosäuresequenzen der dargestellten Enzyme an gleicher Stelle gleiche Aminosäuren, nämlich die Aminosäuren Serin (Ser), Histidin (His) und Asparaginsäure (Asp) aufweisen. Diese Aminosäuren bilden die katalytische Triade der Enzyme.

Fig. 1 zeigt in Gesamtansicht eine dreidimensionale Struktur des Enzyms Bromperoxidase-A2 aus *Streptomyces aureofaciens* ATCC 10762, die durch Röntgenstrukturanalysen erhalten wurde (Hecht et. al, Nature Struct. Biol. 1, S. 532-537 (1994)).

In Fig. 2 ist ein Ausschnitt der dreidimensionalen Struktur des Enzyms BPO-A2 dargestellt. Das aktive Zentrum mit der katalytischen Triade, bestehend aus Serin (Ser 101A), Histidin (His 264A) und Aspartat (Asp 235A), ist deutlich 5 zu erkennen. Zusätzlich sind in Fig. 2 angegeben: Met 102A, Tyr 76A und Trp 211A.

Ausführungsbeispiel 1

Enzymatische, aktiven Sauerstoff liefernde Mischung unter
10 Beteiligung von Chlorperoxidase

Die Mischung besteht aus

- 0,5 mg Chlorperoxidase aus *Streptomyces aureofaciens* TÜ 24 gelöst in Wasser
- 4 ml 1 M Natriumacetat-Puffer pH 4,0 und
- 15 - 15,7 µl (152 µmol) H₂O₂ (30%ig).

Vor Reaktion wird die Wasserstoffperoxidlösung getrennt von den anderen Komponenten gelagert. Diese Mischung soll nachfolgend für die Oxidation von Thioanisol zum entsprechenden Sulfoxid verwendet werden.

20 Dazu werden zu 4 ml 1 M Natriumacetat-Puffer pH 4,0 und 1 ml 1,4-Dioxan 11,8 µl Thioanisol und 15,7 µl H₂O₂ 30%ig gegeben. Dieser Lösung werden 0,5 mg Chlorperoxidase aus *Streptomyces aureofaciens* TÜ 24 zugefügt und die Reaktion für 78 min bei 22 °C inkubiert. Als alleiniges Produkt 25 wurde zu 100 % das Sulfoxid erhalten.

Ausführungsbeispiel 2

Enzymatische, aktiven Sauerstoff liefernde Mischung unter Beteiligung von Bromperoxidase

Die Mischung besteht aus

BERICHTIGTES BLATT (REGEL 91)
ISAVEP

II

- 1 ml 0,1 M Natriumacetat, pH 5,5
- 100 µl 0,03 % H₂O₂-Lösung
- 0,3 µg Bromperoxidase aus *Streptomyces aureofaciens* ATCC 10762.

5 Bis zur Reaktion wird die Wasserstoffperoxidlösung getrennt von den anderen Mischungskomponenten gelagert. Anhand einer Bromierungsreaktion von Monochlordinmedonlösung soll die Anwendung der vorbenannten Mischung beschrieben werden:

Dazu werden zu 1 ml 0,1 M Natriumacetat pH 5,5 10 µl 4,8
10 mM Monochlordinmedonlösung in Ethanol und 100 µl 0,03 % H₂O₂-Lösung gegeben. Dieser Lösung werden 0,3 µg Bromperoxidase aus *Streptomyces aureofaciens* ATCC 10762 sowie 100 µl 1 M Natriumbromidlösung zugefügt.

In dieser Lösung katalysiert die Bromperoxidase die
15 Umwandlung von Natriumacetat in Peressigsäure. Die gebildete Peressigsäure reagiert dann weiter mit dem Natriumbromid. Dadurch wird das Bromidion oxidiert und es kommt zur vollständigen Bromierung des eingesetzten Monochlordinmedons innerhalb von 10 min.

20 Ausführungsbeispiel 3

Enzymatisch, aktiven Sauerstoff liefernde Mischung unter Beteiligung von Chlorperoxidase

Die Mischung besteht analog Ausführungsbeispiel 2 aus

- 1 ml 0,1 M Natriumacetat, pH 5,5
- 100 µl 0,03 % H₂O₂-Lösung
- 0,3 µg Chlorperoxidase aus *Pseudomonas pyrrocinia*.

Bis zur Reaktion werden die Mischungskomponenten getrennt voneinander gelagert. Analog Ausführungsbeispiel 2 wird

diese Mischung zur Bromierung einer Monochlordinomedonlösung angewandt.

In der nachfolgenden Tabelle ist die Abhängigkeit der bromierenden Aktivität der Chlorperoxidase aus Pseudomonas 5 pyrrocinia von der Temperatur aufgeführt:

Tabelle 1

	°C	% Aktivität
10	20	30
	30	50
	40	70
	50	90
	60	100
	15	50

Tabelle 1 zeigt die Enzymaktivität über einen weiten Temperaturbereich, wobei bei 40 bis 70 °C gute und bei 60 °C die besten Ergebnisse erzielt werden.

20 Ausführungsbeispiel 4

Bromierung von Monochlordinomedon mit einer enzymatischen, aktiven Sauerstoff liefernden Mischung unter Verwendung von Enzymen unterschiedlicher Herkunft

Analog Ausführungsbeispiel 2 wird jeweils eine Mischung aus 25 - 1 ml 0,1 M Natriumacetat, pH 5,5

- 100 µl 0,03 % H₂O₂-Lösung und
- 10 mU Enzym CPO-P, CPO-T, BPO-A1, BPO-A2, CPO-F, CPO-L, CPO-S bzw. Ace hergestellt.

Bis zur Reaktion wird die Wasserstoffperoxidlösung getrennt
5 von den anderen Mischungskomponenten gelagert. Anhand einer Bromierungsreaktion von Monochlordinomedonlösung soll die Anwendung der vorbenannten Mischung beschrieben werden:

Dazu werden zu 1 ml 0,1 M Natriumacetat pH 5,5 10 µl 4,8 mM Monochlordinomedonlösung in Ethanol und 100 µl 0,03 %
10 H₂O₂-Lösung gegeben. Dieser Lösung werden 10 mU Enzym sowie 100 µl 1 M Natriumbromidlösung zugefügt.

Anhand der Bromierungsreaktion von Monochlordinomedon zu Monobrommonochlordinomedon wird die Aktivität der enzymatischen Mischung bestimmt. Dabei wird Bromid durch
15 die enzymatisch gebildete Persäure oxidiert und reagiert dann mit dem organischen Substrat Monochlordinomedon. Hierbei führt ein mol Persäure zur Bromierung eines mols Monochlordinomedon. Die Enzyme zeigen je nach Herkunft unterschiedliche spezifische Aktivitäten:

20	Enzym	spez. Aktivität (unit/mg Protein)
	CPO-P	63
	CPO-T	9
	BPO-A1	45
	BPO-A2	15
25	CPO-F	4
	CPO-L	19
	CPO-S	390
Ace		0,013

Ausführungsbeispiel 5**Verfahren zur Herstellung von Peressigsäure**

19 µg Chlorperoxidase werden in 1 ml 1M Natriumacetat, pH 5 4,0 gelöst und mit 5 µl 30 % H₂O₂-Lösung versetzt und für 50 min. bei 30 oC inkubiert. Die dabei entstehende Peressigsäure wird anhand der Oxidationsreaktion von 2-Chloranilin zu 2-Nitrochlorbenzol nachgewiesen.

Nachfolgende Tabellen geben Reaktionsergebnisse bei 10 unterschiedlichen Mengen der Reaktionspartner Acetat und Wasserstoffperoxid wieder.

Tabelle 2:

2-Nitrochlorbenzolbildung in Abhängigkeit von unterschiedlichen H₂O₂-Konzentrationen

15

	H ₂ O ₂ -Anteil	Reaktionsprodukt
	110 mM H ₂ O ₂	95 ng 2-Nitrochlorbenzol
	176 mM H ₂ O ₂	160 ng 2-Nitrochlorbenzol
20	220 mM H ₂ O ₂	200 ng 2-Nitrochlorbenzol
	330 mM H ₂ O ₂	230 ng 2-Nitrochlorbenzol
	440 mM H ₂ O ₂	240 ng 2-Nitrochlorbenzol

Tabelle 3:
2-Nitrochlorbenzolbildung in Abhangigkeit von
unterschiedlichen Acetatkonzentrationen

	Acetat-Konzentration	Reaktionsprodukt
5	20 mM Acetat	30 ng 2-Nitrochlorbenzol
	100 mM Acetat	120 ng 2-Nitrochlorbenzol
	200 mM Acetat	180 ng 2-Nitrochlorbenzol
10	500 mM Acetat	240 ng 2-Nitrochlorbenzol
	1000 mM Acetat	240 ng 2-Nitrochlorbenzol

Die oben aufgeführten Tabellen zeigen eine Abhangigkeit
15 sowohl von der Konzentration von Wasserstoffperoxid als
auch von Acetat. Acetatgehalte bis zu 500 mM führen zu
erhohter Persäureproduktion.

Patentansprüche

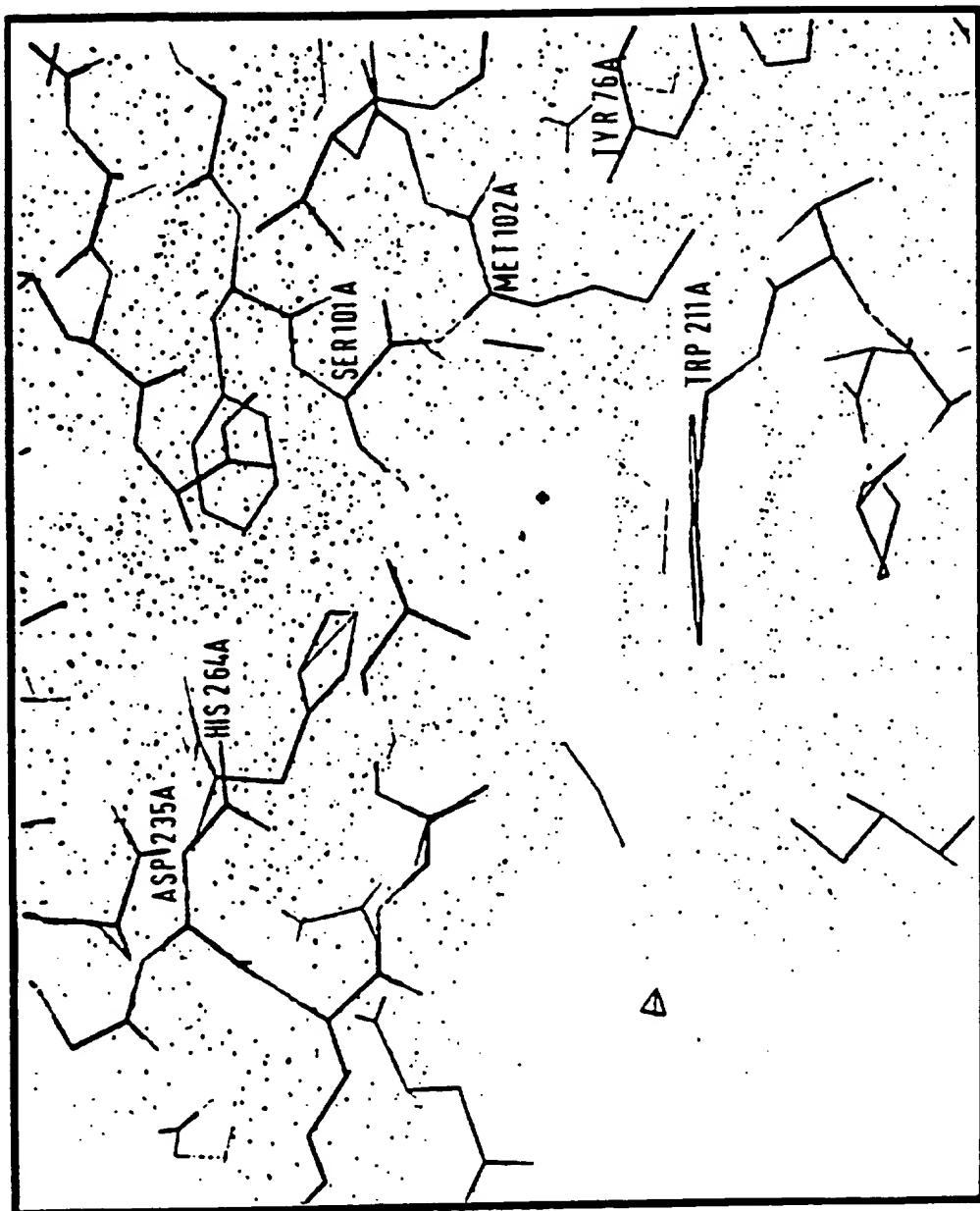
1. Enzymatische, aktiven Sauerstoff bildende Mischung in trockener oder flüssiger Form,
dadurch gekennzeichnet,
5 daß die Mischung aus
 - Oxidoreduktase mit einer α/β -Hydrolase-Faltung und einer katalytischen Triade aus den Aminosäuren Serin, Histidin und Asparaginsäure,
 - einer Peroxidquelle und
 - einer organischen Säure oder deren Salz besteht,
10 und in wässriger Lösung angewandt wird.
2. Mischung nach Anspruch 1,
dadurch gekennzeichnet,
daß die Mischung aus
15 - in Wasser gelöster Oxidoreduktase mit einer α/β -Hydrolase-Faltung und einer katalytischen Triade aus den Aminosäuren Serin, Histidin und Asparaginsäure,
- Peroxidlösung
- einer wässrigen Lösung einer organischen Säure
20 oder deren Salz besteht,
wobei bis zur Anwendung dieser Mischung die Peroxidlösung getrennt von den anderen Komponenten aufbewahrt wird.
- 25 3. Mischung nach Anspruch 1 oder 2,
dadurch gekennzeichnet,
daß als Oxidoreduktase bakterielle Nicht-Häm-Haloperoxidase, als organische Säure Essigsäure oder Propionsäure oder Milchsäure oder deren Salze und als
30 Peroxidquelle Wasserstoffperoxid oder Natriumperborat eingesetzt werden.

4. Mischung nach Anspruch 3,
dadurch gekennzeichnet,
daß als bakterielle Nicht-Häm-Haloperoxidase
Chlorperoxidase oder Bromperoxidase eingesetzt werden.
5. Mischung nach einem der Ansprüche 1 bis 4,
dadurch gekennzeichnet,
daß der Anteil Oxidoreduktase pro 0,15 bis 50 µmol
Wasserstoffperoxid und pro 100 µmol Säure oder deren
Salz 8 bis 16 mU beträgt.
- 10 6. Mischung nach einem der Ansprüche 1 bis 4,
dadurch gekennzeichnet,
daß der Anteil Oxidoreduktase bei Einsatz von
Natriumperborat 8 bis 16 mU pro 0,15 bis 50 µmol in
Lösung freigesetztem Wasserstoffperoxid beträgt.
- 15 7. Verfahren zur Herstellung von organischen Persäuren,
dadurch gekennzeichnet,
daß in Anwesenheit von Oxidoreduktase mit einer α/β-
Hydrolase-Faltung und einer katalytischen Triade aus
den Aminosäuren Serin, Histidin und Asparaginsäure und
20 Wasserstoffperoxid oder Peroxidverbindungen organische
Säuren oder deren Salzen in wässriger Lösung bei einem
pH-Wert von 3,5 bis 6,0 und bei Temperaturen zwischen
15 und 80 °C zu organischen Persäuren umgewandelt
werden.
- 25 8. Verfahren nach Anspruch 7,
dadurch gekennzeichnet,
daß als Oxidoreduktase bakterielle Nicht-Häm-
Haloperoxidase, als Peroxidverbindung Natriumperborat
und als organische Säure Essigsäure oder Propionsäure
30 oder Milchsäure oder deren Salze eingesetzt werden.

9. Verfahren nach Anspruch 8,
dadurch gekennzeichnet,
daß als bakterielle Nicht-Häm-Haloperoxidase
Chlorperoxidase oder Bromperoxidase eingesetzt werden.
- 5 10. Verfahren nach einem der Ansprüche 7 bis 9,
dadurch gekennzeichnet,
daß pro 0,15 bis 50 µmol Wasserstoffperoxid und pro 100
µmol Säure oder Salz 8 bis 16 mU Nicht-Häm-
Haloperoxidase eingesetzt werden.
- 10 11. Verfahren nach Anspruch 8,
dadurch gekennzeichnet,
daß bei Einsatz von Natriumperborat 8 bis 16 mU
Oxidoreduktase pro 0,15 bis 50 µmol in Lösung
freigesetztem Wasserstoffperoxid eingesetzt werden.



Fig. 1

Fig. 2

BERICHTIGTES BLATT (REGEL 91)
ISA/EP

PCT

WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM

Internationales Büro

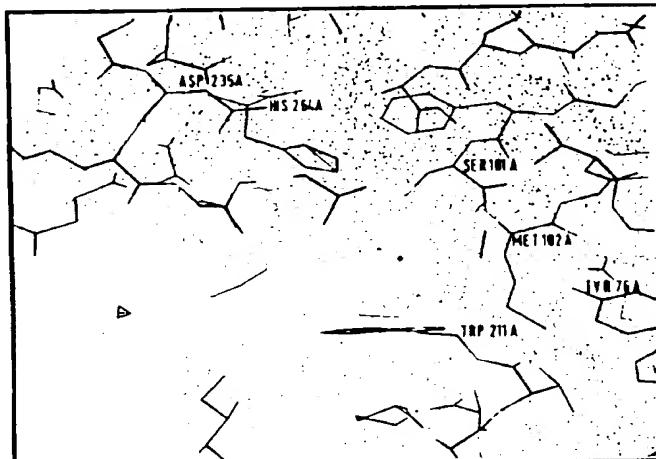


INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation ⁶ : C12P 7/40, C12N 9/08, C11D 3/386	A3	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 96/06909 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 7. März 1996 (07.03.96)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP95/03342		(81) Bestimmungsstaaten: AU, BR, CA, CN, CZ, FI, HU, JP, KR, MX, NO, NZ, PL, RU, SG, SI, SK, UA, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).
(22) Internationales Anmeldedatum: 23. August 1995 (23.08.95)		
(30) Prioritätsdaten: P 44 30 327.0 27. August 1994 (27.08.94) DE		Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i>
(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): DE-GUSSA AKTIENGESELLSCHAFT [DE/DE]; Weissfrauenstrasse 9, D-60311 Frankfurt am Main (DE).		(88) Veröffentlichungsdatum des internationalen Recherchenberichts: 23. Mai 1996 (23.05.96)
(72) Erfinder; und		
(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): VAN PEE, Karl-Heinz [DE/DE]; Lipsiusstrasse 12, D-01309 Dresden (DE). HECHT, Hans-Jürgen [DE/DE]; Erlenkamp 25, D-38126 Braunschweig (DE). BERKESSEL, Albrecht [DE/DE]; Friedrichsfelder Strasse 11a, D-68535 Edingen (DE). SCHRAPEL, Thomas [DE/DE]; Südring 9, D-37120 Bovenden (DE). LAATSCH, Hartmut [DE/DE]; Adolf-Ellissen-Weg 21, D-37077 Göttingen (DE).		

(54) Title: ENZYMATIC, ACTIVE OXYGEN-RELEASING MIXTURE AND PERACID PRODUCTION

(54) Bezeichnung: ENZYMATISCHE, AKTIVEN SAUERSTOFF LIEFERNDE MISCHUNG SOWIE HERSTELLUNG VON PERSÄUREN



(57) Abstract

Enzymatic, active oxygen-releasing mixtures may be used as oxidising agents for preparing chemical compounds and in bleaching, washing, cleaning and disinfecting agents. According to the invention the mixture contains oxidoreductase with an α/β -hydrolase fold and a catalytic triad consisting of aminoacids serine, histidine and aspartic acid, a peroxide source, and an aqueous solution of an organic acid or its salt. In order to produce organic peracids, organic acids or their salts in an aqueous solution are converted into organic peracids in the presence of oxidoreductase with an α/β -hydrolase fold and a catalytic triad consisting of aminoacids serine, histidine and aspartic acid, and hydrogen peroxide or peroxide compounds, at a pH value from 3.5 to 6.0 and temperatures from 15 to 80 °C.

(57) Zusammenfassung

Enzymatische, aktiven Sauerstoff liefernde Mischungen können Anwendung als Oxidationsmittel zur Herstellung chemischer Verbindungen sowie in Bleich-, Wasch-, Reinigungs- und Desinfektionsmitteln finden. Erfindungsgemäß besteht die Mischung aus Oxidoreduktase mit einer α/β -Hydrolase-Faltung und einer katalytischen Triade aus den Aminosäuren Serin, Histidin und Asparaginsäure, einer Peroxidquelle, einer wäßrigen Lösung einer organischen Säure oder deren Salz. Die Herstellung organischer Persäuren erfolgt erfindungsgemäß derart, daß in Anwesenheit von Oxidoreduktase mit einer α/β -Hydrolase-Faltung und einer katalytischen Triade aus den Aminosäuren Serin, Histidin und Asparaginsäure und Wasserstoffperoxid oder Peroxidverbindungen organische Säuren oder deren Salze in wäßriger Lösung bei einem pH-Wert von 3,5 bis 6,0 und bei Temperaturen zwischen 15 und 80 °C zu organischen Persäuren umgewandelt werden.

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AT	Oesterreich	GA	Gabon	MR	Mauretanien
AU	Australien	GB	Vereiniges Königreich	MW	Malawi
BB	Barbados	GE	Georgien	NE	Niger
BE	Belgien	GN	Guinea	NL	Niederlande
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	NO	Norwegen
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	NZ	Neuseeland
BJ	Benin	IE	Irland	PL	Polen
BR	Brasilien	IT	Italien	PT	Portugal
BY	Belarus	JP	Japan	RO	Rumänien
CA	Kanada	KE	Kenya	RU	Russische Föderation
CF	Zentrale Afrikanische Republik	KG	Kirgisistan	SD	Sudan
CG	Kongo	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SE	Schweden
CH	Schweiz	KR	Republik Korea	SI	Slowenien
CI	Côte d'Ivoire	KZ	Kasachstan	SK	Slowakei
CM	Kamerun	LI	Liechtenstein	SN	Senegal
CN	China	LK	Sri Lanka	TD	Tschad
CS	Tschechoslowakei	LU	Luxemburg	TG	Togo
CZ	Tschechische Republik	LV	Lettland	TJ	Tadschikistan
DE	Deutschland	MC	Monaco	TT	Trinidad und Tobago
DK	Dänemark	MD	Republik Moldau	UA	Ukraine
ES	Spanien	MG	Madagaskar	US	Vereinigte Staaten von Amerika
FI	Finnland	ML	Mali	UZ	Usbekistan
FR	Frankreich	MN	Mongolei	VN	Vietnam

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Internat'l Application No
PCT/EP 95/03342

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
 IPC 6 C12P7/40 C12N9/08 C11D3/386

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
 IPC 6 C12P C12N C11D

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO,A,92 18687 (NOVO NORDISK AS) 29 October 1992 see page 5; examples 1-3 ---	1,2
X	WO,A,91 05839 (NOVO NORDISK AS ; PROCTER & GAMBLE) 2 May 1991 see page 7; example 2 ---	1,2
X	EP,A,0 500 387 (EXOXEMIS INC) 26 August 1992 see page 38; examples 3,9,10 ---	1,2
A	WO,A,91 04333 (NOVO NORDISK AS) 4 April 1991 see claims; examples ---	1,7 -/-

Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- 'A' document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- 'E' earlier document but published on or after the international filing date
- 'L' document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- 'O' document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- 'P' document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- 'T' later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- 'X' document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- 'Y' document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- '&' document member of the same patent family

1

Date of the actual completion of the international search 21 March 1996	Date of mailing of the international search report 17 -04- 1996
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax (+ 31-70) 340-3016	Authorized officer Pfannenstein, H

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Item. 1 Application No.
PCT/EP 95/03342

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	FRESENIUS JOURNAL OF ANALYTICAL CHEMISTRY, vol. 342, no. 10, 1992 pages 827-833, WALTER, BALLSCHMITTER 'Formation of C1/C2-bromo-/chloro-hydrocarbons by haloperoxidase reactions' see page 828 - page 832 ---	1-6
A	NATURE STRUCTURAL BIOLOGY, vol. 1, no. 8, August 1994 pages 533-537, HECHT, SOBEK, HAAG; PFEIFER, VAN PEE 'The metal-ion-free oxidoreductase from <i>Streptomyces aureofaciens</i> has an hydrolase fold' cited in the application see page 533 - page 535 ---	1-4
A	JOURNAL OF BACTERIOLOGY, vol. 176, no. 8, April 1994 US, pages 2339-2347, BANTLEON, ALTENBUCHNER, VAN PEE 'Chloroperoxidase from <i>strepomyces</i> <i>lividans</i> ' cited in the application see page 2339 see page 2343 -----	1-4

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP 95/03342

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
WO-A-9218687	29-10-92	EP-A-	0580707	02-02-94
		JP-T-	6506731	28-07-94
		US-A-	5356437	18-10-94

WO-A-9105839	02-05-91	AT-T-	108484	15-07-94
		AU-B-	6515790	16-05-91
		AU-B-	646645	03-03-94
		AU-B-	6516090	16-05-91
		CA-A-	2067748	14-04-91
		CN-A-	1051600	22-05-91
		DE-D-	69010691	18-08-94
		DE-T-	69010691	16-03-95
		WO-A-	9105858	02-05-91
		EP-A-	0497794	12-08-92
		EP-A,B	0495836	29-07-92
		ES-T-	2057593	16-10-94
		JP-T-	5500899	25-02-93
		JP-T-	5503542	10-06-93
		TR-A-	26687	15-05-95
		US-A-	5273896	28-12-93

EP-A-0500387	26-08-92	AU-B-	663869	26-10-95
		AU-B-	1536492	15-09-92
		CA-A-	2061601	22-08-92
		JP-T-	6505482	23-06-94
		WO-A-	9214484	03-09-92
		US-A-	5389369	14-02-95
		US-A-	5451402	19-09-95

WO-A-9104333	04-04-91	AU-B-	639494	29-07-93
		AU-B-	6407490	18-04-91
		CA-A-	2066746	13-03-91
		DE-D-	69005309	27-01-94
		DE-T-	69005309	05-05-94
		EP-A-	0491782	01-07-92
		ES-T-	2049045	01-04-94
		JP-T-	5500605	12-02-93

INTERNATIONALES RECHERCHENBERICHT

Bereich: Dieses Aktenzeichen
PCT/EP 95/03342

A. KLASIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 6 C12P7/40 C12N9/08 C11D3/386

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprässtoff (Klassifikationssystem und Klassifikationsymbole)
IPK 6 C12P C12N C11D

Recherchierte aber nicht zum Mindestprässtoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO,A,92 18687 (NOVO NORDISK AS) 29.Okttober 1992 siehe Seite 5; Beispiele 1-3 ---	1,2
X	WO,A,91 05839 (NOVO NORDISK AS ; PROCTER & GAMBLE) 2.Mai 1991 siehe Seite 7; Beispiel 2 ---	1,2
X	EP,A,0 500 387 (EXOXEMIS INC) 26.August 1992 siehe Seite 38; Beispiele 3,9,10 ---	1,2
A	WO,A,91 04333 (NOVO NORDISK AS) 4.April 1991 siehe Ansprüche; Beispiele ---	1,7 -/-

Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

Siehe Anhang Patentfamilie

- * Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :
- *' A* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
- *' E* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
- *' L* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
- *' O* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
- *' P* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

- *' T* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist
- *' X* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erforderlicher Tätigkeit beruhend betrachtet werden
- *' Y* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erforderlicher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist
- *' &* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

21. März 1996

17 -04- 1996

Name und Postanschrift der Internationale Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+ 31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Pfannenstein, H

INTERNATIONALES RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP 95/03342

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	FRESENIUS JOURNAL OF ANALYTICAL CHEMISTRY, Bd. 342, Nr. 10, 1992 Seiten 827-833. WALTER, BALLSCHMITTER 'Formation of C1/C2-bromo-/chloro-hydrocarbons by haloperoxidase reactions' siehe Seite 828 - Seite 832 ---	1-6
A	NATURE STRUCTURAL BIOLOGY, Bd. 1, Nr. 8, August 1994 Seiten 533-537. HECHT, SOBEK, HAAG; PFEIFER, VAN PEE 'The metal-ion-free oxidoreductase from Streptomyces aureofaciens has an hydrolase fold' in der Anmeldung erwähnt siehe Seite 533 - Seite 535 ---	1-4
A	JOURNAL OF BACTERIOLOGY, Bd. 176, Nr. 8, April 1994 US, Seiten 2339-2347, BANTLEON, ALTENBUCHNER, VAN PEE 'Chloroperoxidase from streptomyces lividans' in der Anmeldung erwähnt siehe Seite 2339 siehe Seite 2343 -----	1-4

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Formblatt PCT/ISA/210 (Anhang Patentfamilie)(Juli 1992)

PCT/EP 95/03342

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO-A-9218687	29-10-92	EP-A- 0580707 JP-T- 6506731 US-A- 5356437	02-02-94 28-07-94 18-10-94
-----	-----	-----	-----
WO-A-9105839	02-05-91	AT-T- 108484 AU-B- 6515790 AU-B- 646645 AU-B- 6516090 CA-A- 2067748 CN-A- 1051600 DE-D- 69010691 DE-T- 69010691 WO-A- 9105858 EP-A- 0497794 EP-A,B 0495836 ES-T- 2057593 JP-T- 5500899 JP-T- 5503542 TR-A- 26687 US-A- 5273896	15-07-94 16-05-91 03-03-94 16-05-91 14-04-91 22-05-91 18-08-94 16-03-95 02-05-91 12-08-92 29-07-92 16-10-94 25-02-93 10-06-93 15-05-95 28-12-93
-----	-----	-----	-----
EP-A-0500387	26-08-92	AU-B- 663869 AU-B- 1536492 CA-A- 2061601 JP-T- 6505482 WO-A- 9214484 US-A- 5389369 US-A- 5451402	26-10-95 15-09-92 22-08-92 23-06-94 03-09-92 14-02-95 19-09-95
-----	-----	-----	-----
WO-A-9104333	04-04-91	AU-B- 639494 AU-B- 6407490 CA-A- 2066746 DE-D- 69005309 DE-T- 69005309 EP-A- 0491782 ES-T- 2049045 JP-T- 5500605	29-07-93 18-04-91 13-03-91 27-01-94 05-05-94 01-07-92 01-04-94 12-02-93
-----	-----	-----	-----